

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 31 日現在

機関番号：82401

研究種目：新学術領域研究(研究領域提案型)

研究期間：2012～2016

課題番号：24116005

研究課題名(和文) 双極性障害の原因神経回路の解明

研究課題名(英文) Elucidation of causative neural circuit of bipolar disorder

研究代表者

加藤 忠史(Kato, Tadafumi)

国立研究開発法人理化学研究所・脳科学総合研究センター・チームリーダー

研究者番号：30214381

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 109,100,000円

研究成果の概要(和文)：我々はミトコンドリア病患者が双極性障害を合併しやすいことに着目し、原因遺伝子であるPolgの変異を持つモデルマウスを作成したところ、うつ病の診断基準を満たす2週間ほどの自発性・反復性のエピソードが多く見られた。このエピソードは、うつ病と同じ治療反応性や副腎皮質ホルモンの変化を示した。変異ミトコンドリアDNAの蓄積部位を調べたところ、視床室傍核に多く蓄積していた。マウスで視床室傍核神経細胞の神経伝達を遮断したところ、同様の状態が現れた。うつ状態を示すミトコンドリア病患者の視床室傍核でもミトコンドリア機能障害を持つ細胞が見られた。本研究は新しい気分安定薬の開発や診断法の開発につながると期待される。

研究成果の概要(英文)：Because mitochondrial disease frequently accompanies bipolar disorder, we developed a model mouse carrying mutant Polg, a causative gene of mitochondrial diseases. The mice showed recurrent spontaneous episodes satisfying the clinical criteria of major depression that responded to anti-depressive treatments and showed alteration of corticosteroid. We identified that mutant mitochondrial DNA is accumulated in paraventricular thalamic nucleus (PVT). Inhibition of neural transmission of PVT neurons caused similar episodes in mice. Cells with mitochondrial dysfunction were found also in paraventricular region of the postmortem brains of patients with mitochondrial disease and mood symptoms. The present findings are expected to lead to development of new mood stabilizers and diagnostic methods.

研究分野：神経科学、精神医学

キーワード：うつ病 双極性障害 ミトコンドリアDNA 視床室傍核

## 1. 研究開始当初の背景

本研究の目的は、二大精神疾患の一つである双極性障害(躁うつ病)の診断法、治療法を開発するため、その原因を解明することである。これまで、双極性障害の研究は、ゲノム研究と脳画像研究が中心であり、その間の神経細胞および神経回路レベルの病態についてはほとんどわかっていなかった。

本研究では、こうしたレベルでの病態、すなわちマイクロエンドフェノタイプを、動物モデルを用いて同定し、これを患者死後脳で確認する。

我々はこれまで、双極性障害患者の磁気共鳴スペクトロスコピーにより、ミトコンドリア病類似の脳エネルギー代謝障害を見いだすと共に、気分障害を伴うことのあるまれな遺伝性疾患、慢性進行性外眼筋麻痺(CPEO)と同様に脳内に変異ミトコンドリアDNAが蓄積していることを示した。

そこで、CPEOの原因遺伝子(Polg)の変異体を脳だけに発現させた遺伝子改変マウスを作成し、双極性障害様の行動変化を呈することを報告した。

双極性障害のマイクロエンドフェノタイプを明らかにするには、このマウスの行動変化がいかなる神経回路の障害によるのかを明らかにする必要がある。

本研究では、このモデルマウスを用いて、双極性障害の原因神経回路を同定する。このマウスにおける行動異常が、原因神経回路にミトコンドリアDNA変異が蓄積した結果、細胞死を引き起こし、視床室傍核の細胞が失われるためであったとすれば、この神経回路を修復する神経幹細胞療法が有効な可能性が考えられる。そこで、マウス神経幹細胞を移植する方法について検討を行う。

## 2. 研究の目的

二大精神疾患の一つである双極性障害(躁うつ病)は、およそ100人に1人弱が罹患する疾患であり、遺伝要因を基盤とした脳疾患と考えられている。双極性障害のうつ状態は、単極性うつ病と区別がつかないが、双極性障害のうつ状態はうつ病と異なり抗うつ薬で悪化してしまう。そのため、脳病態を解明し、脳病態に基づいた診断法を開発する必要がある。

我々は、双極性障害を伴うことのあるまれな遺伝性疾患、慢性進行性外眼筋麻痺(CPEO)の原因遺伝子(Polg)を脳だけに発現させることにより、動物モデルを作成し、性周期に伴う周期的な行動量変化を見いだした。Polg変異は、筋疾患も引き起こしうるものであり、それ自体は双極性障害に特異的とはいえない。従って、双極性障害の病態を明らかにするには、このマウスの行動変化がいかなる神経回路の障害によるのかを明らかにすることが必要である。

本研究の目的は、このモデルマウスを用いて、双極性障害の原因神経回路を同定することである。

## 3. 研究の方法

ミトコンドリアDNA(mtDNA)合成酵素(Polg)の変異体を前脳特異的に発現するトランスジェニックマウス(変異Polg Tgマウス)を用いて、脳全域でミトコンドリア機能障害を有する細胞をマッピングする手法を開発する。

具体的には、マウス脳を環流固定し、自動切片作成装置を用いて薄切片、スライドを作成後、mtDNA由来蛋白質(Cytochrome oxidase)と核DNA由来蛋白質(succinate dehydrogenase)の抗体を用いて染色し、核染色(DAPI)を加えて三重染色とし、蛍光イメージングモジュール付デジタルナノズーム(浜松ホトニクス社)を用いて、スキャンを行い、脳全体の画像を撮像する。z-stack画像を撮像し、NeuroLucida Softwareを用いて立体的に再構成する。

Cox陰性細胞数を自動的にカウントするコンピュータソフトウェアを用いて、脳全域において、Cox陰性細胞数をカウントする。Tgマウスと野生型マウスについてのデータを取得し、Tgマウスと野生型の間で、Cox陰性細胞の蓄積に差が見られる脳部位を同定する。

得られた所見を元に、破傷風毒素を用いた、部位特異的機能的ノックダウンマウスを作成する。具体的には、Cox陰性細胞が多いことが確認し得た、視床室傍核(PVT)特異的なノックダウンマウスを作成し、その行動解析により、双極性障害様の行動表現型を示すかどうか、これがリチウムにより改善するかどうかを確認する。

また、PVTにおける遺伝子発現解析および神経化学解剖学的検討から、障害されている神経回路における特徴的な分子を明らかにし、これを特異的に染色するための抗体を作成し、染色方法を検討する。

神経細胞の変性が見られる場合には、この部位への神経幹細胞移植が有効であるかどうかを検証する。

双極性障害患者死後脳のPVTにおいて、免疫染色により、この部位の異常を可視化し、この部位の異常が双極性障害患者で見られるかどうかを検討すると共に、これがどのような亜型と対応しているのかを明らかにする。

これらの研究を通して、双極性障害のマイクロエンドフェノタイプを明らかにし、双極性障害の疾患概念を再構築する。

## 4. 研究成果

Polgの変異が神経のみで働くモデルマウスでは、2週間ほど活動低下が続く場合があ

ることに気づき、解析を進め、この活動低下を詳細に分析した結果、この状態が平均すると半年に1回見られ、うつ病の診断基準を満たす(興味喪失、睡眠障害、食欲の変化、動作の緩慢、疲れやすい、社会行動の障害)ことを示した。

低活動状態にある変異 Polg マウスは、うつ病と同じような治療反応性(抗うつ薬を投与することで減少するなど)や生理学的変化(副腎皮質ホルモン増加など)を示した。

この活動低下の原因となる脳部位を明らかにするため、異常なミトコンドリア DNA が多く蓄積している脳部位を探索したところ、視床室傍核に多く蓄積していた。

また、同じようなミトコンドリアの機能障害は、うつ状態を示すミトコンドリア病患者の視床室傍核でも見られた。

さらに、このエピソードにおける視床室傍核の意義を明らかにするため、loxP により囲まれた stop シグナルの後に Tet オペレーターをつないだトランスジーンと、Tet により破傷風毒素を発現するトランスジーンを両方を持つトランスジェニックマウスにおいて、アデノ随伴ウイルスベクターを用いて視床室傍核に Cre を発現させ、視床室傍核の神経細胞の神経伝達を人為的に遮断し、行動解析を行った。その結果、類似のエピソードが現れた。これは、モデルマウスのうつ状態が、視床室傍核の病変により生じていることを示している。

なお、変異 Polg マウスの視床室傍核においては、アストロサイトやミクログリアの集積など、細胞死を示唆する所見は得られなかったことから、変異 Polg マウスの視床室傍核では、細胞が失われている訳ではないと考えられた。また、神経幹細胞の投与を行ったが、視床室傍核への生着は見られなかった。

このモデルマウスは自発的かつ反復的なうつ状態を示すモデルマウスとしては初めてのものであり、これまでとは作用メカニズムが異なる抗うつ薬や気分安定薬の開発につながると期待できる。また、今回見いだされた視床室傍核の神経変性を伴わないミトコンドリア機能障害は、双極性障害のマイクロエンドフェノタイプとなりうるものである。

今後の研究で双極性障害やうつ病の一部が、視床室傍核の病変で起きることが証明できれば、精神疾患を脳病理所見により定義することができ、新しい診断法の開発につながる可能性がある。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 11 件)

1) Kasahara T, Ishiwata M, Kakiuchi C,

Fuke S, Iwata N, Ozaki N, Kunugi H, Minabe Y, Nakamura K, Iwata Y, Fujii K, Kanba S, Ujike H, Kusumi I, Kataoka M, Matoba N, Takata A, Iwamoto K, Yoshikawa T, Kato T. Enrichment of deleterious variants of mitochondrial DNA polymerase gene (POLG1) in bipolar disorder. *Psychiatry and Clinical Neurosciences* (in press)

2) Kaneta H, Ukai W, Tsujino H, Furuse K, Kigawa Y, Tayama M, Ishii T, Hashimoto E, Kawanishi C (2017) Antipsychotics promote GABAergic interneuron genesis in the adult rat brain: Role of heat-shock protein production. *92:108-118*

3) Nakajima K, Kazuno A, Kelsoe J, Nakanishi M, Takumi T, Kato T (2016) Exome sequencing in the knockin mice generated using the CRISPR/Cas system. *Scientific Reports* 6: 34703

4) Kataoka M, Matoba N, Sawada T, Kazuno AA, Ishiwata M, Fujii K, Matsuo K, Takata A, Kato T (2016) Exome sequencing for bipolar disorder points to roles of de novo loss-of-function and protein-altering mutations. *Mol Psychiatry* 21: 885-93.

5) Kato T (2016) Neurobiological basis of bipolar disorder: Mitochondrial dysfunction hypothesis and beyond. *Schizophrenia Research* S0920-9964: 30481-9

6) Kato T, Kasahara T, Kubota-Sakashita M, Kato TM, Nakajima K (2016) Animal models of recurrent or bipolar depression. *Neuroscience*, 321: 189-196

7) Kasahara T\*, Takata A\*, Kato TM\*, Kubota-Sakashita M, Sawada T, Kakita A, Mizukami H, Kaneda D, Ozawa K, Kato T(\*co-first authors) (2016) Depression-like Episodes in Mice Harboring mtDNA Deletions in Paraventricular Thalamus. *Molecular Psychiatry*, 21: 39-48

8) Kida S, Kato T (2015) Microendophenotypes of psychiatric disorders: phenotypes of psychiatric disorders at the level of molecular dynamics, synapses, neurons, and

neural circuits. Current molecular medicine, 15: 111-118.

- 9) Fuke S, Kametani M, Yamada K, Kasahara T, Kubota-Sakashita M, Kujoth GC, Prolla TA, Hitoshi S, Kato T (2014) Heterozygous Polg mutation causes motor dysfunction due to mtDNA deletions. Annals of Clinical and Translational Neurology, 1: 909-920
- 10) Kubota-Sakashita M, Iwamoto K, Bundo M, Kato T (2014) A role of ADAR2 and RNA editing of glutamate receptors in mood disorders and schizophrenia. Molecular Brain, 7:5
- 11) Bundo M, Toyoshima M, Okada Y, Akamatsu W, Ueda J, Nemoto-Miyauchi T, Sunaga F, Toritsuka M, Ikawa D, Kakita A, Kato M, Kasai K, Kishimoto T, Nawa H, Okano H, Yoshikawa T, Kato T, Iwamoto K (2014) Increased L1 Retrotransposition in the Neuronal Genome in Schizophrenia. Neuron, 81: 306-313

[学会発表](計 5 件)

- 1) Kato T (2015) Neurobiology of bipolar disorder. The 5th World Congress of Asian Psychiatry, Japan, Fukuoka, Mar. 3-5
- 2) Kato T (2014) Development of mood stabilizers based on mitochondrial dysfunction hypothesis of bipolar disorder. 29th CINP World Congress of Neuropsychopharmacology, Canada, Vancouver, June 22-26
- 3) Kato T (2014) Neurobiological basis of bipolar disorder. 16th annual conference of the international society for bipolar disorders, South Korea, Seoul, Mar. 18-21
- 4) Kato T (2013) Is bipolar disorder a progressive impairment of “ mood stabilizing neurons ” ? 11th World Congress of Biological Psychiatry, Japan, Kyoto, June 23-27
- 5) Kato T (2013) Neurobiology of bipolar disorder. Toward development of new mood stabilizers “Pharmacogenomics and Personalised Medicine in Psychiatry” Plenary Lecture, CINP

2013 Thematic Meeting, Jerusalem, Israel, April 22

[図書](計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況(計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

○取得状況(計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

[その他]  
ホームページ等  
<http://www.brain.riken.go.jp/labs/mdmd/>

6. 研究組織

(1)研究代表者  
加藤忠史 (KATO, Tadafumi)  
国立研究開発法人理化学研究所・脳科学総合研究センター・チームリーダー  
研究者番号： 30214381

(2)研究分担者  
鵜飼渉 (UKAI, Wataru)  
札幌医科大学・医学部・講師  
研究者番号： 40381256

(3)連携研究者  
( )  
研究者番号：

(4)研究協力者  
( )